

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2004 年 1 月 8 日 (08.01.2004)

PCT

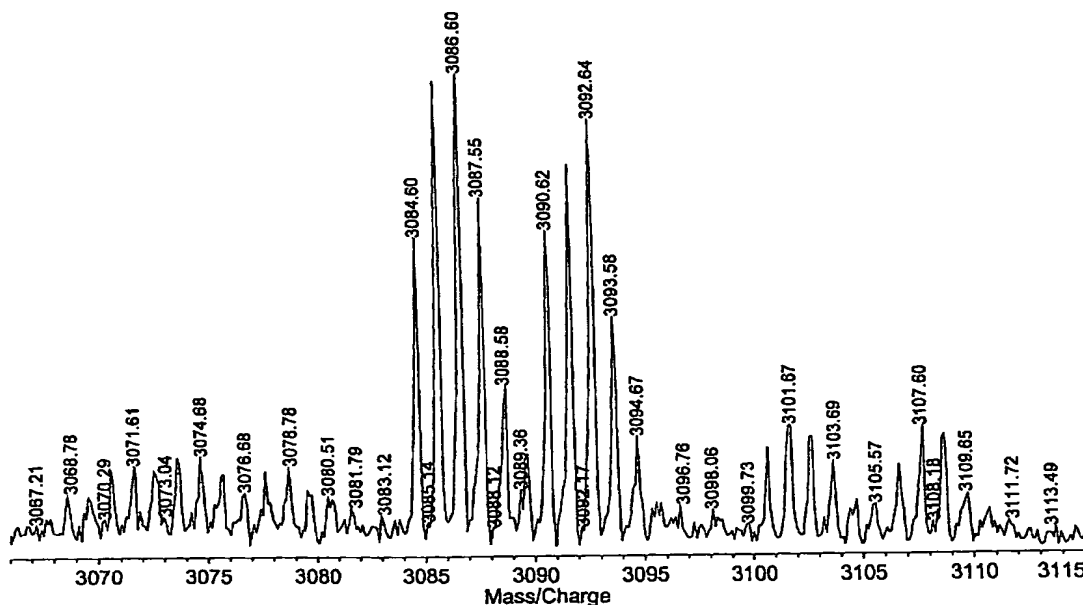
(10) 国際公開番号
WO 2004/002950 A1

- (51) 国際特許分類⁷: C07C 313/08, C07B 59/00, G01N 33/68, 27/62, A61K 38/00
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2003/004308
- (22) 国際出願日: 2003 年 4 月 3 日 (03.04.2003)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2002-191496 2002 年 6 月 28 日 (28.06.2002) JP
特願2002-191497 2002 年 6 月 28 日 (28.06.2002) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社島津製作所 (SHIMADZU CORPORATION) [JP/JP]; 〒604-8511 京都府 京都市 中京区西ノ京桑原町 1 番地 Kyoto (JP).
- (72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 九山 浩樹 (KUYAMA, Hiroki) [JP/JP]; 〒604-8511 京都府 京都市 中京区西ノ京桑原町 1 番地 株式会社島津製作所内 Kyoto (JP). 安藤 英治 (ANDO, Eiji) [JP/JP]; 〒604-8511 京都府 京都市 中京区西ノ京桑原町 1 番地 株式会社島津製作所内 Kyoto (JP). 西村 紀 (NISHIMURA, Osamu) [JP/JP]; 〒604-8511 京都府 京都市 中京区西ノ京桑原町 1 番地 株式会社島津製作所内 Kyoto (JP).
- (74) 代理人: 岡田 正広 (OKADA, Masahiro); 〒540-0010 大阪府 大阪市 中央区材木町 1 番 6 号 第 1 2 新興ビル 10 階 岡田正広特許事務所 Osaka (JP).
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,

[続葉有]

(54) Title: SULFENYL COMPOUND, LABELING REAGENT, AND METHOD OF ANALYZING PEPTIDE

(54) 発明の名称: スルフェニル化合物、ラベル化試薬、及びペプチドの解析方法



(57) Abstract: A sulfenyl compound represented by the general formula R-S-X (1) (wherein R represents an organic group having at least one constituent element labeled with an isotope; and X represents a leaving group); a labeling reagent containing the compound; and a method of peptide analysis which comprises using the labeling reagent. Preferably, the organic group R comprises as constituent elements carbon, hydrogen, and nitrogen and optionally contains oxygen and/or phosphorus, and the isotope is a stable one selected from the group consisting of ²H, ¹³C, ¹⁵N, ¹⁷O, and ¹⁸O.

(57) 要約: (1)一般式:R-S-X(1)(式中、Rは、同位体で標識された少なくとも1つの構成元素を有する有機基を表し、Xは脱離基を表す。)で表されるスルフェニル化合物、それを含むラベル化試薬、及びそのラベ

[続葉有]



ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,

GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明 細 書

スルフェニル化合物、ラベル化試薬、及びペプチドの解析方法

技術分野

本発明は、生体細胞又は組織中の発現タンパク質の網羅的解析に関し、より詳しくは、発現タンパク質の解析に好適な化合物、それを用いたラベル化試薬、及びラベル化試薬を用いた発現タンパク質の定量的解析技術に関する。

背景技術

スルフェニル化合物は、トリプトファン残基のインドール環と反応するため、従来からトリプトファン残基の選択的ラベル化試薬として知られている。タンパク質の解析法としては、従来から２次元ゲル電気泳動（２Ｄ－PAGE）による方法が用いられている。この方法においては、まず、生体試料から抽出されたタンパク質を２Ｄ－PAGEを用いて分離・精製し、２次元的に得られるゲルイメージから目的とするスポットを切り出す。次いで還元アルキル化、酵素消化などの工程を経てマスマスペクトロメトリーにより（例えばPMF法）、注目するスポットがどのようなタンパク質であるかを解析する。また、ディファレンシャルディスプレイにより２種の生体試料中のタンパク質の相対量比を求めることができる。

しかしこの方法では、高濃度で含まれるタンパク質（ハウスキーピングタンパク質）が存在する場合、低濃度で存在する調節タンパク質などは細胞全体のライセートを分析した場合、ほとんど検出できないという問題がある。また、ディファレンシャルディスプレイでの定量性が不十分であること、ゲル板の不均一性に起因する再現性の無さ、高分子タンパク質の分離が困難であることなども問題であった。

一方、昨今のポストゲノムの流れの中で、タンパク質の効率的な消化方法、消化によって生じた複雑なポリペプチド混合物の分離方法、及びポリペプチドのアミノ酸配列を解析するマスペクトルのイオン化法が開発され、ペプチドをマスペクトルで解析できるようになった。これに伴い、マスペクトルを応用するという観点からのペプチドの解析法が種々考案されてきており、新規で有用なラベル化試薬が求められている。このような観点から開発された試薬の1つに、I C A T (Isotope Coded Affinity Tag) 試薬が挙げられる。これを用いる方法は、ワシントン大学の Aebersold らにより開発された、タンパク質発現量の変化を定量する方法の1つである。(例えば、非特許文献：R.Aebersold et al., Nature Biotech., 1999, 17, 994-999、特許文献：WO 00/11208 参照) I C A T 法ではタンパク質中のシステイン残基に注目し、ビオチンを含有する特殊なアルキル化試薬によりシステインの S H 基をラベル化する。この方法は発現された広い量的な差異を持つ生体内タンパク質を定量することができ、タンデムマスと組み合わせ発現量が増減したタンパク質の同定も可能である。

しかし、タンパク質中のシステイン含量が大きい場合、上記の方法では最終的に得られるマスペクトルが複雑であることが予想される。また、ラベル化されたペプチドフラグメントを分離するためにアビジンカラムという特殊なカラムを必要とすることや、反応試薬の分子量が比較的大きい(600程度)ため反応性が十分でないことも問題である。

発明の開示

発明の目的

そこで、本発明の目的は、反応性及び選択性に優れ、マスペクトルでの解析が容易で定量性も高く、かつ特殊なカラムを必要としないラベル化試薬に用いることができるスルフェニル化合物、それを用いたラベル化試薬、及びそのラベル化試薬を用いたタンパク質・ペプチドの解析方法を提供することにある。

発明の概要

本発明者らは、鋭意検討した結果、同位体で標識された少なくとも1つの構成元素を有するスルフェニル化合物によって、上記目的が達成されることを見出し、本発明を完成するに至った。

本発明には、以下の発明が含まれる。

(1) 一般式：



(式中、Rは、同位体で標識された少なくとも1つの構成元素を有する有機基を表し、Xは脱離基を表す。)

で表されるスルフェニル化合物。

(2) 前記有機基Rは構成元素としてC、H、N、場合によりO及び／又はPを含み、前記同位体は、 ^2H 、 ^{13}C 、 ^{15}N 、 ^{17}O 、 ^{18}O からなる群から選ばれる安定同位体である、(1)に記載のスルフェニル化合物。

(3) 前記スルフェニル化合物の分子量が、前記化合物と同一構造であり且つ前記同位体で標識されていない化合物の分子量よりも3～12、好ましくは6～10大きい、(1)又は(2)に記載のスルフェニル化合物。

(4) 前記同位体で標識された構成元素の数が3以上例えば3～12、好ましくは6～10である、(1)～(3)のいずれかに記載のスルフェニル化合物。

(5) 前記有機基Rは、置換されていても良いアルキル基、又は置換されていても良いアリール基である、(1)～(4)のいずれかに記載のスルフェニル化合物。

(6) 前記置換されていても良いアルキル基が有する置換基は、 NO_2 基、 COOH 基、 SO_3H 基、 OH 基、アルコキシ基、アリール基、アリールオキシ基からなる群から選ばれる、(5)に記載のスルフェニル化合物。

(7) 前記置換されていても良いアリール基が有する置換基は、 NO_2 基、

COOH基、SO₃H基、OH基、アルキル基、アルコキシ基、アリアル基、アリアルオキシ基からなる群から選ばれる、(5)に記載のスルフェニル化合物。

(8) 前記有機基Rは、置換されていても良いフェニル基である、(5)又は(7)に記載のスルフェニル化合物。

(9) 前記脱離基Xがハロゲン原子である、(1)～(8)のいずれかに記載のスルフェニル化合物。

(10) 2-ニトロ [¹³C₆] ベンゼンスルフェニルクロリド、4-ニトロ [¹³C₆] ベンゼンスルフェニルクロリド、2, 4-ジニトロ [¹³C₆] ベンゼンスルフェニルクロリド、及び2-ニトロ-4-カルボキシ [¹³C₆] ベンゼンスルフェニルクロリドからなる群から選ばれる、(1)～(5)及び(7)～(9)のいずれかに記載のスルフェニル化合物。

(11) 一般式：



(式中、Rは、同位体で標識された少なくとも1つの構成元素を有する有機基を表し、Xは脱離基を表す。)

で表されるスルフェニル化合物を含むラベル化試薬。

(12) 前記有機基Rは構成元素としてC、H、N、場合によりO及び/又はPを含み、前記同位体は、²H、¹³C、¹⁵N、¹⁷O、¹⁸Oからなる群から選ばれる安定同位体である、(11)に記載のラベル化試薬。

(13) 前記スルフェニル化合物の分子量が、前記化合物と同一構造であり且つ前記同位体で標識されていない化合物の分子量よりも3～12、好ましくは6～10大きい、(11)又は(12)に記載のラベル化試薬。

(14) 前記同位体で標識された構成元素の数が3以上、例えば3～12、好ましくは6～10である、(11)～(13)のいずれかに記載のラベル化試薬。

(15) 前記有機基Rは、置換されていても良いアルキル基、又は置換されていても良いアリール基である、(11)～(14)のいずれかに記載のラベル化試薬。

(16) 前記置換されていても良いアルキル基が有する置換基は、NO₂基、COOH基、SO₃H基、OH基、アルコキシ基、アリール基、アリールオキシ基からなる群から選ばれる、(15)に記載のラベル化試薬。

(17) 前記置換されていても良いアリール基が有する置換基は、NO₂基、COOH基、SO₃H基、OH基、アルキル基、アルコキシ基、アリール基、アリールオキシ基からなる群から選ばれる、(15)に記載のラベル化試薬。

(18) 前記有機基Rは、置換されていても良いフェニル基である、(15)又は(17)に記載のラベル化試薬。

(19) 前記脱離基Xがハロゲン原子である、(11)～(18)のいずれかに記載のラベル化試薬。

(20) 前記スルフェニル化合物が、2-ニトロ [¹³C₆] ベンゼンスルフェニルクロリド、4-ニトロ [¹³C₆] ベンゼンスルフェニルクロリド、2, 4-ジニトロ [¹³C₆] ベンゼンスルフェニルクロリド、及び2-ニトロ-4-カルボキシ [¹³C₆] ベンゼンスルフェニルクロリドからなる群から選ばれる、(11)～(15)及び(17)～(19)のいずれかに記載のラベル化試薬。

(21) ペプチドの解析の用途における、(11)～(20)のいずれかに記載のラベル化試薬。

以下、本明細書においてペプチドとは、タンパク質を含む意味で用いる。

(22) 前記スルフェニル化合物から選ばれた1つの化合物(以下、「重い試薬」と表記する。)と、前記重い試薬と同一構造であり且つ前記同位体で標識されていない化合物(以下、「軽い試薬」と表記する。)とをそれぞれ別個に含む、(1)～(21)のいずれかに記載のラベル化試薬。

本発明のラベル化試薬は、前記重い試薬は、前記軽い試薬との分子量の差が3

～12、好ましくは6～10となるように設計されていることが好ましい。

(23) 一般式：



(式中、Rは、同位体で標識された少なくとも1つの構成元素を有する有機基を表し、Xは脱離基を表す。)

で表されるスルフェニル化合物を含むラベル化試薬を用いるペプチドの解析法。

(24) 前記有機基Rは構成元素としてC、H、N、場合によりO及び/又はPを含み、前記同位体は、 ^2H 、 ^{13}C 、 ^{15}N 、 ^{17}O 、 ^{18}O からなる群から選ばれる安定同位体である、(23)に記載のペプチドの解析法。

(25) 前記スルフェニル化合物の分子量が、前記化合物と同一構造であり且つ前記同位体で標識されていない化合物の分子量よりも3～12、好ましくは6～10大きい、(23)又は(24)に記載のペプチドの解析法。

(26) 前記同位体で標識された構成元素の数が3以上、例えば3～12、好ましくは6～10である、(23)～(25)のいずれかに記載のペプチドの解析法。

(27) 前記有機基Rは、置換されていても良いアルキル基又はアリール基である、(23)～(26)のいずれかに記載のペプチドの解析法。

(28) 前記置換されていても良いアルキル基が有する置換基は、 NO_2 基、 COOH 基、 SO_3H 基、 OH 基、アルコキシ基、アリール基、アリールオキシ基からなる群から選ばれる、(27)に記載のペプチドの解析法。

(29) 前記置換されていても良いアリール基が有する置換基は、 NO_2 基、 COOH 基、 SO_3H 基、 OH 基、アルキル基、アルコキシ基、アリール基、アリールオキシ基からなる群から選ばれる、(27)に記載のペプチドの解析法。

(30) 前記有機基Rが置換されていても良いフェニル基である、(27)又は(29)に記載のペプチドの解析法。

(31) 前記脱離基Xが、ハロゲン原子である、(23)～(30)のいずれかに記載のペプチドの解析法。

(32) 前記式(1)で表される同位体で標識されたスルフェニル化合物が、2-ニトロ [$^{13}\text{C}_6$] ベンゼンスルフェニルクロリド、4-ニトロ [$^{13}\text{C}_6$] ベンゼンスルフェニルクロリド、2,4-ジニトロ [$^{13}\text{C}_6$] ベンゼンスルフェニルクロリド、及び2-ニトロ-4-カルボキシ [$^{13}\text{C}_6$] ベンゼンスルフェニルクロリドからなる群から選ばれる、(23)～(27)及び(29)～(31)のいずれかに記載のペプチドの解析法。

(33) 前記ラベル化試薬が、前記式(1)で表される同位体で標識されたスルフェニル化合物から選ばれた1つの化合物(重い試薬)と、前記選ばれた化合物と同一構造であり且つ前記同位体で標識されていない化合物(軽い試薬)とをそれぞれ別個に含む、(23)～(32)のいずれかに記載のペプチドの解析法。

本発明のペプチドの解析法においては、前記重い試薬が、前記軽い試薬との分子量の差が3～12、好ましくは6～10となるように設計されていることが好ましい。

(34) 前記ラベル化試薬を用いて、解析すべきペプチドのアミノ酸残基をラベル化し、得られたラベル化ペプチドをマスマスペクトロメトリーにより測定する、(23)～(33)のいずれかに記載のペプチドの解析法。

(35) (i) 解析すべきペプチドを、前記重い試薬及び前記軽い試薬のいずれか一方を用いてラベル化し、ラベル化された解析すべきペプチドを得て、

(ii) 別途、対照ペプチドを、前記重い試薬及び前記軽い試薬のいずれか他方を用いてラベル化し、ラベル化された対照ペプチドを得て、

(iii) (i) で得られたラベル化された解析すべきペプチドと(ii) で得られたラベル化された対照ペプチドとを混合し、

(iv) 混合したラベル化ペプチドをマスマスペクトロメトリーによって測定する、(

34) に記載のペプチドの解析法。

(36) 必要に応じて酵素消化及び／又は還元とアルキル化とによる化学的処理を行う、(34) 又は (35) に記載のペプチドの解析法。

(37) 前記酵素消化を前記ラベル化の前又は後に行う、(36) に記載のペプチドの解析法。

(38) 前記化学的処理を前記ラベル化の前又は後に行う、(36) に記載のペプチドの解析法。

(39) 前記化学的処理、前記酵素消化、及び前記ラベル化をこの順で行う、(36) に記載のペプチドの解析法。

(40) 前記化学的処理、前記ラベル化、及び前記酵素消化をこの順で行う、(36) に記載のペプチドの解析法。

(41) 前記ラベル化、前記化学的処理、及び前記酵素消化をこの順で行う、(36) に記載のペプチドの解析法。

(42) 前記ラベル化の後、必要に応じゲル濾過による分離と逆相カラムを用いる分離とを含むラベル化ペプチドの精製を行う、(34) に記載のペプチドの解析法。

(43) 前記アミノ酸残基がトリプトファン残基である、(34) に記載のペプチドの解析法。

(44) (23) に記載のペプチドの解析法によって見出されるペプチドを含む新規化合物。

(45) (23) に記載のペプチドの解析法によって見出されるペプチドを含む新規化合物から開発される医薬品候補化合物。

図面の簡単な説明

図1は、実施例3のLCチャートである。

図2は、実施例4のカラムの分離におけるラベル化ペプチドフラグメントの

ピーク対の数を表したグラフである。

図 3 は、実施例 5 のマススペクトルチャートである。

図 4 は、実施例 6 のマススペクトルチャートである。

図 5 は、図 4 のマススペクトルチャートの続きである。

図 6 は、実施例 8 のマススペクトルチャートである。

発明を実施するための形態

本発明は、式：



(式中、R は、同位体で標識された少なくとも 1 つの構成元素を有する有機基を表し、X は脱離基を表す。)

で表されるスルフェニル化合物である。このスルフェニル化合物は、同定すべき化合物のラベル化試薬として用いることができ、特に、ペプチド解析におけるラベル試薬として有用である。

また、前記重い試薬と前記軽い試薬とをそれぞれ別個に含む 2 種の試薬を組み合わせたラベル化試薬を用いることにより、マススペクトルを応用したペプチドの解析が容易になる。

上記式 (1) 中、有機基 R は、構成元素として C、H、N、場合により O 及び / 又は P を含む置換基である。また、前記同位体は安定同位体が好ましく、このようなものとしては、 ^2H 、 ^{13}C 、 ^{15}N 、 ^{17}O 、 ^{18}O などが挙げられる。

重い試薬と軽い試薬とを組み合わせることでペプチドのラベル化試薬として用いるとき、重い試薬によってラベル化されたペプチド及び軽い試薬によってラベル化されたペプチドを混合してマススペクトロメトリーによって測定する。この場合、前述の同位体の存在によって、それぞれのラベル化ペプチドの質量数に差が生じる。この差は、重い試薬の分子量と軽い試薬の分子量との差に相当する。

このとき、質量数の差は3～12ダルトンが好ましく、6～10ダルトンがより好ましい。質量数の差が3ダルトン以上開くことにより、重い試薬による化学修飾を受けたラベル化ペプチドと、軽い試薬による化学修飾を受けたラベル化ペプチドとの双方のスペクトルピークが重なりにくくなるため、解析がしやすい。

このことから、本発明のスルフェニル化合物の分子量は、その化合物と同一構造であり且つ同位体で標識されていない化合物の分子量よりも3～12大きいことが好ましく、6～10大きいことがより好ましい。従って、本発明のスルフェニル化合物が同位体として ^2H 、 ^{13}C 、 ^{15}N 、 ^{17}O などの質量数が1大きい同位体のみを含む場合、同位体で標識された構成元素の数は3以上、例えば3～12個が好ましく、6～10個がより好ましい。

一方、本発明のスルフェニル化合物が同位体として ^{18}O などの質量数が2大きい同位体を含む場合は、3以上の質量数の差を与えるために3個以上の同位体を必要としない場合もある。例えば、同位体として ^{18}O のみを含むスルフェニル化合物の場合、 ^{18}O で標識された構成元素が2個あれば、マススペクトルにおいて4ダルトンの差が生じ、好ましい質量数の差を与えることができる。

そして、これら本発明のスルフェニル化合物を重い試薬とし、軽い試薬とを組み合わせたラベル化試薬として用いる場合は、重い試薬の分子量は、軽い試薬の分子量との差が3～12となるように設計されることが好ましく、6～10となるように設計されることがより好ましい。

前記(1)式中の有機基Rは、置換されていても良いアルキル基又は置換されていても良いアリール基であることが好ましい。前記置換されていても良いアルキル基が有する置換基は、 NO_2 基、 COOH 基、 SO_3H 基、 OH 基、アルコキシ基、アリール基、アリールオキシ基などが挙げられるが、これらに限定されない。

また、前記置換されていても良いアリール基が有する置換基は、 NO_2 基、 COOH 基、 SO_3H 基、 OH 基、アルキル基、アルコキシ基、アリール基、アリ

ールオキシ基などが挙げられるが、これらに限定されない。

これら置換基は、当該試薬の反応性、溶解性などを調節するため適宜選択することができる。

また、前記有機基 R は、置換されていても良いフェニル基であることが好ましい。

好ましく設定された有機基 R を有することにより、ラベル化試薬として用いた時に、逆相カラムなど通常のカラムにより容易にラベル化ペプチドの分離ができるようになる。

前記 (1) 式中の脱離基 X としては、F、Cl、Br、I などのハロゲン原子が挙げられるが、これらに限定されない。

本発明のスルフェニル化合物の分子量は、ラベル化すべきペプチドとの反応性を考慮して、190 程度が好ましい。

特に、本発明のスルフェニル化合物としては、2-ニトロ [$^{13}\text{C}_6$] ベンゼンスルフェニルクロリド、4-ニトロ [$^{13}\text{C}_6$] ベンゼンスルフェニルクロリド、2,4-ジニトロ [$^{13}\text{C}_6$] ベンゼンスルフェニルクロリド、及び 2-ニトロ-4-カルボキシ [$^{13}\text{C}_6$] ベンゼンスルフェニルクロリドが好ましい。

本発明のスルフェニル化合物は、対応するジスルフィド、チオール、スルフィドなどからハロゲン化などの方法により合成できる。例えば、有機基 R として 6 個の ^{13}C で標識されたフェニル基を有するスルフェニル化合物を、例えばスルフィドから合成する方法として、以下に記述する方法が挙げられる。】

まず、前駆体のスルフィドは、例えばニトロ [$^{13}\text{C}_6$] クロロベンゼンなどの [$^{13}\text{C}_6$] ベンゼン誘導体にベンジルメルカプタンを反応させることにより、[$^{13}\text{C}_6$] フェニルベンジルスルフィドとして得る。

次に、得られた [$^{13}\text{C}_6$] フェニルベンジルスルフィドに、ハロゲン化剤を反応させ、目的とするスルフェニル化合物を得る。ハロゲン化剤としては、スルフリルクロリドや臭素などを用いると良い。溶媒としては、四塩化炭素、エチレンク

ロリドなどを用いると良い。反応条件としては、例えば10℃～45℃で5分～1時間かけて反応させる。

これらの諸条件は、当業者が適宜定めると良い。

このようにして得られたスルフェニル化合物の同定は、得られたスルフェニル化合物のマススペクトルと、その化合物と同一構造であり且つ同位体標識されていない化合物のマススペクトルとを比較することによって行うことができる。また、双方の ^{13}C 及び ^1H NMRをそれぞれ比較することによっても同定を行うことができる。

本発明のスルフェニル化合物を用いることにより、同定すべき化合物に目印として標識置換基（R-S-基）を導入することができるため、ラベル化試薬として用いることができる。

スルフェニル化合物は、ペプチド中に存在するトリプトファン残基のインドール環と選択的に反応することが知られているため、特に本発明の同位体で標識されたスルフェニル化合物は、ペプチドの解析におけるラベル化試薬として有用である。

トリプトファンはタンパク質において、機能面及び活性面において重要な役割を演じているアミノ酸である。トリプトファンを含むペプチドとしては、副腎皮質刺激ホルモン（ACTH）、ガラニン（Galanin）、副甲状腺ホルモン（PTH）、 α -キモトリプシン、グラミシジンA、リゾチームなどが挙げられる。

トリプトファンのタンパク質中含有量は、アミノ酸の中でも最も少ない部類に属するため、ラベル化反応及び酵素消化後のペプチドのマススペクトルが単純となり、その解析が容易となる。これはプロテオーム解析を行う上で大変有利である。

スルフェニル化合物（同位体で標識された本発明のスルフェニル化合物及び従来の標識されていないスルフェニル化合物）は、トリプトファン残基が有するイ

ンドール環への求電子置換反応によって、トリプトファン残基をラベル化する。この反応は、I C A T法におけるシステイン残基とI C A T試薬との求核置換反応よりも反応性が高いということが期待できる。

スルフェニル化合物によるラベル化によって生成したラベル化トリプトファン残基含有ペプチドは、ラベル化前のトリプトファン残基含有ペプチドよりも疎水性が高いため、I C A T法で用いるような特殊なカラムを使用することなくその分離・精製を行うことができる。たとえば、ゲル濾過や逆相カラムなどで十分分離・精製が可能である。

本発明のペプチドの解析法は、解析すべきペプチドのアミノ酸残基をラベル化し、得られたラベル化ペプチドをマスマススペクトロメトリーにより測定する。解析すべきペプチドは、2種以上のペプチドの混合物である場合もある。本発明は、ラベル化反応、マスマススペクトルの測定の工程を含む。重い試薬と軽い試薬とを組み合わせたラベル化試薬を用いる場合は、ラベル化反応、必要に応じラベル化ペプチドの混合、及びマスマススペクトルの測定の工程を含む。

また本発明は、必要に応じ、好ましくは酵素的処理によるペプチドの断片化（酵素消化）、及び／又は還元とアルキル化とによる化学的処理の工程を含む。

さらに本発明は、必要に応じ、ゲル濾過による分離と、逆相カラムを用いる分離とを含む精製の工程を含む。

上記工程のうち、ラベル化、酵素消化、及び化学的処理の各工程を組み合わせた本発明における過程としては、(a) 酵素消化の後にラベル化を行う過程、(b) ラベル化の後に酵素消化を行う過程、(c) 化学的処理の後にラベル化を行う過程、(d) ラベル化の後に化学的処理を行う過程、(e) 化学的処理、酵素消化、及びラベル化をこの順で行う過程、(f) 化学的処理、ラベル化、及び酵素消化をこの順で行う過程、及び、(g) ラベル化、化学的処理、及び酵素消化をこの順で行う過程が挙げられる。

重い試薬と軽い試薬とを組み合わせたラベル化試薬を用いる場合、解析すべきペプチドのサンプルとは別に、対照ペプチドのサンプルを用意する。解析すべきペプチドが2種以上のペプチドの混合物である場合は、対照ペプチドも対応する2種以上のペプチドの混合物を用いることができる。サンプルの例としては、例えば、解析すべきペプチドのサンプルが病細胞に由来するタンパク質であり、対照ペプチドのサンプルが前記病細胞に対応する正常細胞に由来するタンパク質である場合が挙げられる。この場合、対応するこれらのサンプルは互いにペプチド構成が異なる。解析すべきペプチドのサンプル及び対照ペプチドのサンプルとしては、それぞれ1種類ずつ用いても良いし、一方及び／又は他方を2種類以上用いても良い。

ラベル化反応は、通常の方法を用いて行う。重い試薬と軽い試薬とを組み合わせたラベル化試薬を用いる場合は、解析すべきペプチドを、重い試薬及び軽い試薬のいずれか一方を用いてラベル化を行い、別途、対照ペプチドを、重い試薬及び軽い試薬のいずれか他方を用いてラベル化を行う。例えば、解析すべきペプチドを重い試薬を用い、対照ペプチドを軽い試薬を用いてラベル化しても良いし、解析すべきペプチドを軽い試薬を用い、対照ペプチドを重い試薬を用いてラベル化しても良い。

このようにして別々にラベル化することによって、少なくとも2種類のラベル化ペプチドを得ることができる。

本発明においては、ラベル化に加え、必要に応じて、ペプチドの断片化を行うことができる。断片化は酵素消化によって行うことが好ましい。(以下、断片化を酵素消化によって行うとして本発明を説明する。)酵素消化は前記ラベル化の前又は後に行うことができる。すなわち本発明には(a)酵素消化の後にラベル化を行う過程、又は(b)ラベル化の後に酵素消化を行う過程が含まれる。

酵素消化に用いる酵素は、高い基質特異性を有するトリプシン、リシルエンド

ペプチダーゼ、トロンビン、プラスミン、カリクレイン、ウロキナーゼなどのエンドペプチダーゼが好ましい。酵素消化によって、ペプチドはペプチドフラグメントに断片化される。

また、本発明においては、ラベル化に加え、必要に応じ、還元反応とアルキル化反応とによる化学的処理を行うことができる。後述する理由で、化学的処理と前記ラベル化との順番は任意である。すなわち本発明には、(c) 化学的処理の後にラベル化を行う過程、(d) ラベル化の後に化学的処理を行う過程が含まれる。アルキル化の形態としては、S-カルバミドメチル化やS-カルボキシメチル化などが挙げられるが、これらに限定されない。

解析すべきペプチドはシステイン残基やジスルフィド結合を有することがある。システイン残基のSH基は反応性が高いため、ジスルフィド結合を形成しジチオ基に変化しやすく、予期せぬペプチド構造を形成することがある。ジスルフィド結合は高いpH環境において他のジスルフィド結合と交換する性質があるため、通常高いpH環境で行われる酵素消化の段階でペプチド構造が変化し、解析が困難になることがある。化学的処理を行うと、この問題を回避することができる。すなわち化学的処理においては、酵素消化で影響を受けやすいジチオ基を、前記還元反応によってジスルフィド結合を還元的に開裂させ、アルキル化することによってアルキルチオ基へ変化させる。

従って、前記酵素消化と化学的処理とを組み合わせで行う場合（すなわち、本発明においてラベル化、酵素消化、及び酵素消化を組み合わせで行う場合）は、化学的処理の後に酵素消化を行うことが好ましい。

ここで、前記したように、酵素消化は前記ラベル化の前でも後でも行うことができる。従って、(化学的処理の後に行われる) 酵素消化をラベル化の前に行う場合は、本発明には、(e) 化学的処理、酵素消化、及びラベル化をこの順で行う過程が含まれる。

一方、(化学的処理の後に行われる)酵素消化をラベル化の後に行う場合は、酵素消化はこれら3つの工程で最後に行うこととなる。酵素消化の前に行われる化学的処理とラベル化との順番は前述のように任意であるため、この場合、本発明には、(f) 化学的処理、ラベル化、及び酵素消化をこの順で行う過程、又は、(g) ラベル化、化学的処理、及び酵素消化をこの順で行う過程が含まれる。

化学的処理とラベル化との順番が任意である理由は次のとおりである。

解析すべきペプチドがシステイン残基を有する場合、システイン残基は本発明におけるラベル化によって、トリプトファン残基と同様にラベル化され得る。従って、システイン残基のラベル化という副反応を回避する目的で、前記化学的処理はラベル化の前に行うことができる。

しかし、前記化学的処理はラベル化の後に行うこともできる。前述のように、解析すべきペプチドにシステイン残基が含まれている場合、このシステイン残基はラベル化において副反応をもたらす。このとき、システイン残基とラベル化試薬とが反応して形成される結合はジスルフィド結合である。副反応で形成されたジスルフィド結合は、前記化学的処理によって還元的開裂及びアルキル化することができる。従って、本発明においては、化学的処理をラベル化の後に行うこともできる。

以上の理由で、本発明において化学的処理とラベル化との順番は任意である。

前述のようにして、解析すべきペプチドからラベル化ペプチド又はラベル化ペプチドフラグメントを得る。(以下、ラベル化ペプチド又はラベル化ペプチドフラグメントを単にラベル化ペプチド分子と表記する。また、ラベル化反応が未反応のペプチド又はペプチドフラグメントを未ラベル化ペプチド分子と表記する。)ラベル化ペプチド分子は、精製されることが好ましい。ラベル化ペプチド分子は、トリプトファン残基がラベル化されており、未ラベル化ペプチド分子よりも疎水

性が高い。このため、通常使用されるODSなどを用いた逆相カラムによって、ラベル化ペプチド分子と未ラベル化ペプチド分子との分離が容易にできる。従って本発明においては、ICAT法で用いるような特殊なカラムを使用する必要がなくなるという利点がある。

また、逆相カラムでの精製を行う前に、ゲル濾過を行うことがより好ましい。ゲル濾過用担体は、セファデックス、バイオゲル、アガロースゲルなどが挙げられるが、セファデックスが好ましい。また、セファデックスはLH20が最適である。ゲル濾過によって、未反応及び加水分解を受けたラベル化試薬を分離することができ、より純度の高いラベル化ペプチド分子を得ることができる。

必要に応じ精製されたラベル化ペプチド分子は、マスペクトロメトリーによって測定される。重い試薬と軽い試薬とを組み合わせたラベル化試薬を用いた場合は、マスペクトルの測定を行う前に、解析すべきペプチドのサンプル及び対照ペプチドのサンプルを混合することができる。これによりそれぞれのサンプルのラベル化ペプチド分子が混合される。それぞれのラベル化ペプチド分子は、マスペクトルの測定時に混合された状態であれば良いため、混合する時期は、ラベル化の後、マスペクトルの測定の前であれば、酵素消化、化学的処理、又は精製のいずれの段階でも良い。混合されたラベル化ペプチド分子は、マスペクトロメトリーによって測定される。

マスペクトロメトリーのイオン化法としては、FD法、SIMS法、FAB法、MALDI法、ESI法などが挙げられる。分析計としては、二重収束質量分析計、四重極型分析計、飛行時間型(TOF)質量分析計、フーリエ変換質量分析計、イオンサイクロトロン質量分析計などが挙げられる。

本発明においては、マスペクトル(MS)の結果と、タンデムマスペクトル(MS/MS)の結果とを組み合わせることでペプチドの解析を行うことができる。

重い試薬と軽い試薬とを組み合わせたラベル化試薬を用いた場合、マスペクトル(MS)では、軽い試薬の分子量と重い試薬の分子量との差に相当する質量

数の差を有するフラグメントイオンの対ピークを見つけることができる。この積分比は、それぞれのサンプルに存在するラベル化ペプチドのモル比に相当し、すなわち、対応するもとの解析すべきペプチドと対照ペプチドとのモル比に相当する。また、タンデムマススペクトル (MS/MS) と、データベースの検索とにより得られる配列情報から、それぞれのラベル化ペプチド分子に相当するもとの解析すべきペプチドと対照ペプチドとをそれぞれ同定することができる。

なお、解析すべきペプチドのサンプル又は対照ペプチドのサンプルのいずれか一方には含まれているペプチドが、いずれか他方には対応するペプチドとして含まれていない場合がある。すなわち、サンプルの一方にはペプチドが発現していて、いずれか他方には対応するペプチドが発現していない場合がある。この場合、マススペクトルにおいては、一方にシグナルが観測されるが、他方には対応するシグナルが観測されないため、混合されたサンプルのスペクトルからはこのようなペプチド由来のシグナルを見つけることは困難である。従ってこのような場合は、本発明のペプチドの解析法における全ての工程、すなわち、ラベル化、酵素消化、化学的処理、精製、及びマススペクトルの測定を、各サンプルにおいて別々に行うと良い。そして、スペクトルチャートの横軸 (質量/電荷) (m/z) を等幅にして出力し、両者を比較して見ることで相対量比が 1 : 0 のシグナルを探し求めることによって解析を行うことができる。

前述のように、本発明によると、適切なスルフェニル化合物を得ることによって、ペプチド解析におけるラベル化をより反応性良く、より選択性良く行うことができるラベル化試薬を提供することができる。また、そのような反応性及び選択性に優れたラベル化試薬をペプチドの解析に用いることによって、解析すべきタンパク質のサンプル、及び対照ペプチドのサンプルにそれぞれ存在している対応ペプチドの種類とその発現量の違いとをより正確且つ容易に知ることができる。

。また、特定のペプチドがサンプル中の他のペプチドに比べてどれ位含まれているかということもより正確且つ容易に知ることができる。このように本発明によると、発現タンパク質の網羅的解析をより定量的且つ効率的に行うことができる。本発明の方法によると、発現タンパク質レベルで通常細胞と病細胞とのペプチド構成の違いを知ることができるため、病細胞の活動化段階をコントロールしているメカニズム等を解明する手がかりを知ることができる。すなわち、本発明によって明らかにされたペプチドが特定の疾患に関与するものである場合、該ペプチドを標的として特異的に作用し、その機能を効果的に制御する化合物をコンピュータで理論的にデザインすることによって、医薬品候補化合物を創出することができる。また、該ペプチドをコードする遺伝子の情報を見出し、該遺伝子の発現を特異的に制御する物質を医薬品候補化合物として創出することができる。本発明の方法は、これら医薬品候補化合物の創出をより効率的なものにすることができる。

実施例

以下に実施例により本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれらにより限定されるものではない。

[実施例 1 : スルフェニル化合物の合成]

本実施例では、2-ニトロ [$^{13}\text{C}_6$] ベンゼンスルフェニルクロリド (重い試薬) を、対応するスルフィドから合成した。

(スルフィドの合成)

1 g ($6.1 \times 10^{-3} \text{ mol}$) の 2-ニトロクロロ [$^{13}\text{C}_6$] ベンゼンを 1 ml のメタノールに溶解し、ここに 0.8 g ($6.6 \times 10^{-3} \text{ mol}$) のベンジルメルカプタン、0.8 ml (0.01 mol) のピリジンを加え、16 時間加熱還流した。室温に放冷し 2-ニトロ [$^{13}\text{C}_6$] フェニルベンジルスルフィドを析出

させ、この結晶を濾別し、メタノールで洗浄した。風乾後黄色結晶として2-ニトロ $[^{13}\text{C}_6]$ フェニルベンジルスルフィド 1.38 g (90%) が得られた。

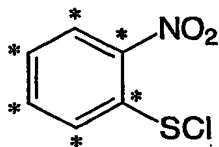
(重い試薬の合成)

前述のようにして得られた2-ニトロ $[^{13}\text{C}_6]$ フェニルベンジルスルフィド 1.38 g ($5.5 \times 10^{-3} \text{ mol}$) にエチレンクロリド 10 ml を加え、さらにスルフリルクロリド 940 mg ($7.9 \times 10^{-3} \text{ mol}$) を加え、室温で攪拌した。反応溶液を湯浴で $50 \sim 60^\circ\text{C}$ に加温しながら減圧濃縮した。得られた油状物に石油エーテルを加え、生じた結晶を濾別した。結晶を石油エーテルで洗浄し、風乾して2-ニトロ $[^{13}\text{C}_6]$ ベンゼンスルフェニルクロリドを 938 mg (87%) を得た。

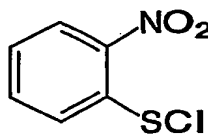
(同定)

得られた重い試薬と、対応する軽い試薬(2-ニトロ $[^{12}\text{C}_6]$ ベンゼンスルフェニルクロリド)とをそれぞれマスマスペクトロメトリーにより測定した。重い試薬と軽い試薬の構造式を化1に示す。式中、*は、 ^{13}C で標識された炭素原子を表す。

化1



重い試薬



軽い試薬

・ 重い試薬

(m/z) 195.10(M^+ , 34.1), 160.10(15.2), 144.10(4.7), 131.10(25.0), 114.10(15.6),
99.20(100.0), 83.10(10.6), 71.20(32.3), 54.20(12.3)

・ 軽い試薬

(m/z) 189.00(M^+ , 35.3), 154.10(15.8), 138.10(4.9), 125.10(26.3), 108.10(17.6),
93.10(100.0), 78.10(14.1), 66.10(32.2), 50.20(15.3)

重い試薬と軽い試薬とのマススペクトルを比較すると、分子イオン及びベンゼン環を有するフラグメントイオンは全て6ダルトンの差があり、それぞれのフラグメントピークの強度は全て同程度であった。

【実施例2：分離実験】

モデルペプチドとして ACTH、Galanin 及び PTH、ラベル化試薬として 2-ニトロ [12C6] ベンゼンスルフェニルクロリド (軽い試薬) を用い、ラベル化されたペプチドとラベル化されていないペプチドとが分離されるかどうかを確認する実験を行った。

ACTH 160 μ g (5.4×10^{-8} mol) を 70% 酢酸水溶液 100 μ l に溶解した。ここに 2-ニトロ [12C6] ベンゼンスルフェニルクロリド 0.41 mg (40 mol) を加え、室温下 1 時間ボルテックスミキサーにより攪拌した。反応溶液を氷冷後、氷冷したエーテル 800 μ l を加え、遠心分離した。沈殿を氷冷したエーテルで洗浄し、ラベル化体を得た。ラベル化したペプチドと、ラベル化に供しなかったペプチドとをそれぞれ混合し、逆相カラム (LC) による分離を行った。Galanin 及び PTH についても同様にして分離を行い、それぞれの保持時間を以下に示した。(ラベル化したペプチドは、mod-を用いて表した。) なお、簡略された系であるため、酵素消化は行わなかった。

(保持時間)

| | |
|-------------|--------|
| ACTH | 16.57分 |
| mod-ACTH | 34.78分 |
| Galanin | 21.78分 |
| mod-Galanin | 35.27分 |
| PTH | 24.78分 |
| mod-PTH | 35.47分 |

(条件)

A buffer : 0.01M HCOOH-Et₃N (pH 4.5)

B液 : CH₃CN

B液の勾配 : 0%~100%を50分かけて流した。

カラム : Shimpack VP-ODS, 250*4.5mm

上に示すように、ラベル化されたものとそうでないものとは、3種全てにおいて保持時間に10~18分の差が生じた。従って、LCによってラベル化ペプチドのみを分離できることが分かった。

また、2-ニトロ [¹³C₆] ベンゼンスルフェニルクロリド (重い試薬) を用いて同様の分離実験を行ったところ、保持時間は同一であったため、重い試薬でもラベル化ペプチドのみを分離できることが分かった。

[実施例3 : 分離実験]

(ラベル化)

モデルタンパク質としてリゾチームを用い、実施例2と同じ趣旨の分離実験を行った。本実施例では、ラベル化、化学的処理、及び酵素消化をこの順で行った

リゾチームを実施例2と同様の方法で「軽い試薬」を用いてラベル化し、洗浄、凍結乾燥した。次いで以下に示す方法により化学的処理（ジスルフィド結合の還元及びS-カルバミドメチル化）と酵素消化とを行った。

（ジスルフィド結合の還元）

ここに、100mM NH_4HCO_3 溶液を加えて溶解し、1つのジスルフィド結合に対し50倍量のDTTを加え、56℃で1時間反応させた。

（S-カルバミドメチル化）

反応溶液を室温まで放冷後、ヨードアセトアミドの100mM NH_4HCO_3 溶液を加え、室温で1時間反応させた。反応溶液をセファデックスG10のカラムで精製し、凍結乾燥した。

（酵素消化）

ここに50mM NH_4HCO_3 - 5mM CaCl_2 溶液に溶解したトリプシンを適当量加え、37℃、16時間反応させた。

上述の一連の処理を行って得られたラベル化ペプチドフラグメントを含む消化物を、LCにより分離した。このときのLCチャートを図1に示す。図1においては、横軸に保持時間（分；min）、縦軸にピーク強度（mAU）を表す。その結果、保持時間29～39分の画分（detected fraction a）に目的とするラベル化ペプチドフラグメントが全て含まれていた。表1は、LCの前（before LC）におけるリゾチーム由来ペプチドと、LCの後（after LC）に detected fraction a (Fr.a) において観測されたリゾチーム由来ペプチドフラグメントとのマスペクトルにおける（質量／電荷）(m/z)を比較してまとめたものである。表中、括弧内の数字はアミノ酸配列の番号を表し、Wが付された数字はラベル化されたトリプトファンを含有するペプチドフラグメントを表す。

表 1

| before LC | after LC (Fr.a) |
|--------------------|--------------------|
| 874.81 (15-21) | |
| 1198.86 (117-125W) | 1198.45 (117-125W) |
| 1299.74 (62-68W) | 1299.25 (62-68W) |
| 1429.06 (34-45) | |
| 1479.03 (22-33W) | 1479.38 (22-33W) |
| 1487.07 (115-125W) | 1486.42 (115-125W) |
| 1754.34 (46-61) | |

(条件)

A : 0.1% TFA

B : 0.07% TFA in CH₃CN

Bの勾配 : 0%~100%を100分かけて流した。

カラム : Shimpack VP-ODS、150*4.6mm

上に示すように、LCによってラベル化ペプチドフラグメントのみを分離できることが分かった。

また、2-ニトロ [¹³C₆] ベンゼンスルフェニルクロリド (重い試薬) を用いて同様の分離実験を行ったところ、重い試薬でもラベル化ペプチドのみを分離できることが分かった。

[実施例 4 : 分離実験]

本実施例では、ラット (ウィスター (Wister)) 血清を用い、ラベル化、酵素消化及び分離精製後、実際に目的とするトリプトファン含有ペプチドフラグメントがどのように濃縮されてくるのかを調べる実験を行った。サンプルは、ラット血

清 2 μ l (総蛋白量 100 μ g) を 2 サンプル用意し、それぞれについて一方のサンプルは「軽い試薬」、他方のサンプルは「重い試薬」を用いて実施例 2 と同様にしてラベル化した。これらを混合し、実施例 3 と同様にして化学的処理及び酵素消化を行い、ラベル化ペプチドフラグメントを含む消化物を得た。次いでセファデックス LH 20 のカラムで分離精製を次のような条件で行った。

カラム容量 : 2.0 ml

分取容量 : 120 μ l

溶離溶媒 : 30% アセトニトリル

分取後、1 フラクションづつ MALDI-TOFMS で確認を行い、6 ダルトンの差で現れるラベル化ペプチドフラグメントのピークを観測した。図 2 は、このピーク対の数をカウントし、グラフ化したものである。図 2 は、横軸に分取番号

(fraction number)、縦軸にピーク対の数 (number of pair peaks) を表す。図 2 が示すように、フラクションの 16 から 23 くらいまで目的のピーク対が見られた。すなわち、分取については 1.8 ml から 2.8 ml の計 1 ml を取れば良いことがわかった。また実際は、これより多少多めにとってもかまわない事がわかった。

[実施例 5]

本実施例では、トリプトファン残基とシステイン残基とを両方有するペプチドを用いた。実施例 3 及び 4 のように、ラベル化を化学的処理の前に行う場合、システイン残基はトリプトファン残基と同様にラベル化され、ラベル化の直後は、システイン残基及びトリプトファン残基が両方ラベル化されたペプチドが生成し得る。このペプチドが化学的処理後にはトリプトファン残基のみがラベル化されたペプチドに変換されることを確認する実験を行った。

NDDGGFSEEWEAQRDShLGC (配列表の配列番号 1) の配列を有するペプチド、presinilin-1(331-349)-Cys (Bachem 社製、MW=2252.3) を用い、実施例 2 と同様にしてラベル化を行った。ラベル化前のペプチドの MALDI-TOFMS のスペクトルチャート (シグナル強度: 108 mV) を図 3 下段に示し、ラベル化によって得られたラベル化ペプチドの MALDI-TOFMS のスペクトルチャート (シグナル強度: 21 mV) を図 3 中段に示す。なお、図 3 中の全てのチャートにおいて、横軸は (質量/電荷) ((Mass/Charge); (m/z)) を表し、縦軸はイオンの相対強度 (%Int.) を表す。これらチャートが示すように、(m/z)=2252.04 のシグナルを与える配列表の配列番号 1 のペプチドが、(m/z)=2559.44 のシグナルを与える化合物に変化した。これは、トリプトファンとシステインの両方がラベル化されたペプチド NDDGGFSEEW(Nbs)EAQRDSHLGC(Nbs) (配列表の配列番号 2) に相当する。ここで W(Nbs) は、ラベル化されたトリプトファン残基を表し、C(Nbs) は、ラベル化されたシステイン残基を表す。

次に、還元・アルキル化による一連の化学的処理を、それぞれ TCEP とヨードアセトアミドとによって行った。このとき得られたペプチドの MALDI-TOFMS のスペクトルチャート (シグナル強度: 60 mV) を図 3 上段に示す。これらチャートが示すように、(m/z)=2559.44 のシグナルを与える配列表の配列番号 2 のペプチドが、(m/z)=2436.6 のシグナルを与える化合物へと変化した。これはラベル化によるシステイン上の標識置換基が還元剤で開裂し、ヨードアセトアミドによりアミドメチル化 (AM) されたペプチド NDDGGFSEEW(Nbs)EAQRDSHLGC(AM) (配列表の配列番号 3) である。ここで、C(AM) は、アミドメチル化されたシステイン残基を表す。

[実施例 6 : 定量的解析]

まず、サンプルペプチドとして ACTH、Galanin を用い、2つの異なる状態の細胞をこれらのペプチドの含有比率を次のように設定することでモデル化した。

- ・セルA ACTH : Galanin = 1 : 1 (モル比)
- ・セルB ACTH : Galanin = 1 : 2 (モル比)
- ・セルAとセルBとの含有 ACTH 比 セルA : セルB = 1 : 1 (モル比)
- ・セルAとセルBとの含有 Galanin 比 セルA : セルB = 1 : 2 (モル比)

次に、これら各々の系について、セルAについては「軽い試薬」を用い、セルBについては「重い試薬」を用い、実施例2と同様の方法でラベル化反応を行った。これらの系は簡略化されたものであるため、化学的処理及び酵素消化は行わなかった。

さらに、ラベル化反応後のこれら2つの系を混合し、セファデックスG25を用いてゲル濾過した。

ゲル濾過したペプチドを、LCを用いてラベル化ペプチドのみを分離した。このようにして得られたラベル化ペプチドを、MALDI-TOFMSによって測定した。得られたマスペクトルを図4及び図5（図4の続き）に示した。図4及び図5において、横軸は（質量／電荷）（(Mass/Charge) ; (m/z)）を表し、縦軸はイオンの相対強度（%Int.）を表す。

マスペクトルの結果より、イオンのピーク強度比から、設定したペプチド含有率が正確に反映された。なお、「軽い試薬」によって修飾を受けたペプチドをL-mod、「重い試薬」によって修飾を受けたペプチドをH-modと表記した。

・イオンピーク

(m/z) = 3086.60 [ACTH(L-mod)], 3092.64 [ACTH(H-mod)], 3316.68 [Galanin(L-mod)], 3322.68 [Galanin(H-mod)]

・ピーク強度比

ACTH(L-mod) : ACTH(H-mod) = 1 : 1

Galanin(L-mod) : Galanin(H-mod) = 1 : 2

〔実施例 7 : 定量的解析〕

モデルペプチドとして、 α -ラクトアルブミン(LCA_BOVIN)、グリセルアルデヒド-3-フォスフェートデヒドロゲナーゼ(G3P_RABIT)、フォスホリラーゼ B (PHS2_RABIT)、及びオボアルブミン(OVAL_CHICK) (全てシグマ社製) を用い、2つの異なる状態の細胞をこれらのペプチドの含有比率を次のように設定することでモデル化した。

- ・セル A LCA_BOVIN、G3P_RABIT、PHS2_RABIT、OVAL_CHICK
(全て 12.5 μ g ずつ含有)
- ・セル B LCA_BOVIN、G3P_RABIT、PHS2_RABIT、OVAL_CHICK
(全て 25 μ g ずつ含有)
- ・セル A とセル B との含有ペプチド比 セル A : セル B = 1 : 2 (モル比)

次に、これら各々の系について、セル A については「軽い試薬」を用い、セル B については「重い試薬」を用い、実施例 2 と同様の方法でラベル化反応を行った。ラベル化後 2 つの溶液を混合し、次いで実施例 3 と同様に化学的処理及び酵素消化を行い、ラベル化ペプチドフラグメントを含む消化物を得た。この消化物をセファデックス LH 20 のカラムで分離精製して MALDI-TOFMS 分析を行った。その結果を表 2 に示す。表 2 には遺伝子名 (Gene Name)、同定されたペプチドの配列 (Peptide Sequence Identified)、(軽い試薬でラベル化されたペプチドの量) / (重い試薬でラベル化されたペプチドの量) の実測比 (Observed Ratio ($^{13}\text{C}_0 / ^{13}\text{C}_6$))、(軽い試薬でラベル化されたペプチドの量) / (重い試薬でラベル化されたペプチドの量) の理論比 (Expected Ratio ($^{13}\text{C}_0 / ^{13}\text{C}_6$))、実測比の平均と理論比との差 (Mean \pm -SD)、及びエラー値 (Error(%)) を示す。

表 2 に示すように、用いたサンプルペプチド各々について、ラベル化ペプチドフラグメントに由来するトリプトファン含有ペプチドフラグメントが同定できた。さらに、観測されたそれぞれの実測比については、エラー値が 9 % 以下であり、理論比と良い一致を示した。

表 2

| Gene Name | Peptide Sequence Identified | Observed Ratio ($^{13}\text{C}_0 / ^{13}\text{C}_6$) | Expected Ratio ($^{13}\text{C}_0 / ^{13}\text{C}_6$) | Mean+-SD | Error(%) |
|------------|-----------------------------|--|--|------------|----------|
| LCA_BOVIN | IWCK | 0.48 | 0.5 | 0.46+-0.04 | 4 |
| | LDQWLCEK | 0.43 | | | |
| | LDQWLCEKL | 0.51 | | | |
| | VGINYNLAHK | 0.40 | | | |
| OVAL_CHICK | GLWEK | 0.45 | 0.5 | 0.54+-0.09 | 9 |
| | GLWEKAFK | 0.63 | | | |
| G3P_RABIT | LWR | 0.48 | 0.5 | 0.49+-0.01 | 1 |
| | LISWYDNEFGYSNR | 0.50 | | | |
| PHS2_RABIT | WIR | 0.48 | 0.5 | 0.45+-0.03 | 2 |
| | EWTR | 0.46 | | | |
| | EWTRMVIR | 0.42 | | | |

(同定されたペプチドフラグメント)

・ LCA_BOVIN 由来

IWCK (配列表の配列番号 4)

LDQWLCEK (配列表の配列番号 5)

LDQWLCEKL (配列表の配列番号 6)

VGINYNLAHK (配列表の配列番号 7)

・ G3P_RABIT 由来

GLWEK (配列表の配列番号 8)

GLWEKAFK (配列表の配列番号 9)

・ PHS2_RABIT 由来

LWR

LISWYDNEFGYSNR (配列表の配列番号 10)

・ OVAL_CHICK 由来

WIR

EWTR (配列表の配列番号 11)

EWTRMVIR (配列表の配列番号 12)

[実施例 8 : 定量的解析]

本実施例ではラット (ウィスター) の血清にサンプル蛋白質である卵白リゾチーム (シグマ社製) を加えて、実際にリゾチーム由来のシグナルが観測されるかどうかを調べた (スパイクテスト)。2つの異なる状態の細胞をこのペプチドの含有量を次のように設定することでモデル化した。

・セル A ラット血清 $5 \mu\text{l}$ + 卵白リゾチーム $3 \mu\text{g}$ (0.21 nmol)

・セル B ラット血清 $5 \mu\text{l}$ + 卵白リゾチーム $6 \mu\text{g}$ (0.42 nmol)

・セル A とセル B との含有リゾチーム比 セル A : セル B = 1 : 2 (モル比)

なお、用いたラット血清 $5 \mu\text{l}$ 中の総蛋白量は 0.28 mg 、アルブミンは 0.14 mg (2.1 nmol) である。

次に、これら各々についてセル A については「重い試薬」を用い、セル B については「軽い試薬」を用い実施例 2 と同様の方法でラベル化反応を行った。ラベル化後の反応溶液を混合し、次いで実施例 3 と同様に化学的処理及び酵素消化を行い、ラベル化ペプチドフラグメントを含む消化物を得た。この消化物をセファデックス LH 20 のカラムで分離精製して MALDI-TOFMS 分析を行った。このときのスペクトルチャートを図 6 に示す。図 6 中、横軸は (質量/電荷)

(Mass/Charge) ; (m/z) を表し、縦軸はイオンの相対強度 (%Int.) を表す。図 6 に示すようにリゾチーム由来のフラグメント、(m/z) = 1199.33、1205.27 が観測され、ピークの強度比は 2 : 1 であった。従って、実測比 (observed ratio) は 2 であり、理論比 (expected ratio) 2 と一致した。すなわち、エラー値は 0 % である。このことは、生体サンプル中においても添加したリゾチームの相対比がそのまま酵素消化後に得られたペプチドフラグメントの相対比として得られたことを示している。

上記実施例の結果が示すように、本発明の方法を用いるとエラー値が全て 9 % 以下となり、高い定量性を示した。

[実施例 9 : 定量的解析]

本実施例では実際の生体試料を用いて定量的解析を行った。

以下の 2 つの系統のラット血清を用いた。

A : SPF/VAF Crj Wister rat (正常ラット)

B : SPF/VAF GK/Crj rat (高血糖ラット、血糖値 372 mg/dl)

各々のラットからの血清を 2 μ l ずつサンプルとして用い、LCQ DecaXP (Thermo Finnigan 社製) -LCAd-Vp システム (關島津製作所製) によって ESI-MS/MS 測定を行った以外は実施例 7 と同様に定量的解析を行った。その結果、その結果を表 3 に示す。表 3 には遺伝子名 (Gene Name)、同定されたペプチドの配列 (Peptide Sequence Identified)、(正常ラット由来のペプチドの量) / (高血糖ラット由来のペプチドの量) の実測比 (Observed Ratio (Wister / GK)) を示す。

表 3

| Gene Name | Peptide Sequence Identified | Observed Ratio (Wister / GK) |
|-------------|-----------------------------|------------------------------|
| Alb | AWAVAR | 1 |
| transferrin | NTAAWAK | 1 |
| P2rx7 | WKIRK | 1 |

(同定されたペプチドフラグメント)

AWAVAR (配列表の配列番号 1 3)

NTAAWAK (配列表の配列番号 1 4)

WKIRK (配列表の配列番号 1 5)

上述のように、実施例においては、スルフェニル化合物として 2-ニトロ [$^{13}\text{C}_6$] ベンゼンスルフェニルクロリドを合成し、それをラベル化試薬として用い、ACTH、Galanin、PTH、リゾチーム、ラット血清、presinilin-1(331-349)-Cys、 α -ラクトアルブミン、グリセルアルデヒド-3-フォスフェートデヒドロゲナーゼ、フォスフォリラーゼ B、及びオボアルブミンの解析に用いた。しかし、本発明は、上記スルフェニル化合物に限られることなく、一般式 (I) で表されるすべてのスルフェニル化合物に適用される。また、本発明のラベル化試薬は、一般式 (I) で表されるすべてのスルフェニル化合物を用いることができる。さらに、本発明の方法は、上記ペプチドに限られることなく、タンパク質を含めるすべてのペプチドに適用することができる。そのため、前述の実施例はあらゆる点で単なる例示に過ぎず、限定的に解釈してはならない。さらに、特許請求の範囲の均等範囲に属する変更は、全て本発明の範囲内のものである。

なお、配列表フリーテキスト (人工配列の記載 (Description of Artificial Sequence)) において、配列番号 1 は、プレセニリン-1 (331-349)-Cys

であり、配列番号 2 は、ラベル化されたプレセニン-1 (3 3 1 - 3 4 9)-Cys
であり、配列番号 3 はアミドメチル化されたラベル化プレセニン-1 (3 3 1 -
3 4 9)-Cys である。

産業上の利用可能性

本発明によれば、反応性及び選択性に優れ、マススペクトルでの解析が容易で
定量性も高く、かつ特殊なカラムを必要としないラベル化試薬に用いることがで
きるスルフェニル化合物、それを用いたラベル化試薬、及びそのラベル化試薬を
用いたタンパク質・ペプチドの解析方法が提供される。

請 求 の 範 囲

1. (1) 一般式：



(式中、Rは、同位体で標識された少なくとも1つの構成元素を有する有機基を表し、Xは脱離基を表す。)

で表されるスルフェニル化合物。

2. 前記有機基Rは構成元素としてC、H、N、場合によりO及び/又はPを含み、前記同位体は、 ^2H 、 ^{13}C 、 ^{15}N 、 ^{17}O 、 ^{18}O からなる群から選ばれる安定同位体である、請求の範囲第1項に記載のスルフェニル化合物。

3. 前記スルフェニル化合物の分子量が、前記化合物と同一構造であり且つ前記同位体で標識されていない化合物の分子量よりも3～12大きい、請求の範囲第1項に記載のスルフェニル化合物。

4. 前記同位体で標識された構成元素の数が3以上である、請求の範囲第1項に記載のスルフェニル化合物。

5. 前記有機基Rは、置換されていても良いアルキル基、又は置換されていても良いアリール基である、請求の範囲第1項に記載のスルフェニル化合物。

6. 前記置換されていても良いアルキル基が有する置換基は、 NO_2 基、 COOH 基、 SO_3H 基、 OH 基、アルコキシ基、アリール基、アリールオキシ基からなる群から選ばれる、請求の範囲第5項に記載のスルフェニル化合物。

7. 前記置換されていても良いアリール基が有する置換基は、 NO_2 基、 COOH 基、 SO_3H 基、 OH 基、アルキル基、アルコキシ基、アリール基、アリールオキシ基からなる群から選ばれる、請求の範囲第5項に記載のスルフェニル化合物。

8. 前記有機基Rは、置換されていても良いフェニル基である、請求の範囲第5項に記載のスルフェニル化合物。

9. 前記脱離基Xがハロゲン原子である、請求の範囲第1項に記載のスルフェニル化合物。

10. 2-ニトロ [$^{13}\text{C}_6$] ベンゼンスルフェニルクロリド、4-ニトロ [$^{13}\text{C}_6$] ベンゼンスルフェニルクロリド、2, 4-ジニトロ [$^{13}\text{C}_6$] ベンゼンスルフェニルクロリド、及び2-ニトロ-4-カルボキシ [$^{13}\text{C}_6$] ベンゼンスルフェニルクロリドからなる群から選ばれる、請求の範囲第1項に記載のスルフェニル化合物。

11. 一般式：



(式中、Rは、同位体で標識された少なくとも1つの構成元素を有する有機基を表し、Xは脱離基を表す。)

で表されるスルフェニル化合物を含むラベル化試薬。

12. 前記有機基Rは構成元素としてC、H、N、場合によりO及び/又はPを含み、前記同位体は、 ^2H 、 ^{13}C 、 ^{15}N 、 ^{17}O 、 ^{18}O からなる群から選ばれる安定同位体である、請求の範囲第1項に記載のラベル化試薬。

13. 前記スルフェニル化合物の分子量が、前記化合物と同一構造であり且つ前記同位体で標識されていない化合物の分子量よりも3~12大きい、請求の範囲第1項に記載のラベル化試薬。

14. 前記同位体で標識された構成元素の数が3以上である、請求の範囲第1項に記載のラベル化試薬。

15. 前記有機基Rは、置換されていても良いアルキル基、又は置換されていても良いアリール基である、請求の範囲第1項に記載のラベル化試薬。

16. 前記置換されていても良いアルキル基が有する置換基は、 NO_2 基、 COOH 基、 SO_3H 基、 OH 基、アルコキシ基、アリール基、アリールオキシ基からなる群から選ばれる、請求の範囲第15項に記載のラベル化試薬。

17. 前記置換されていても良いアリール基が有する置換基は、 NO_2 基、C

OH基、SO₃H基、OH基、アルキル基、アルコキシ基、アリール基、アリールオキシ基からなる群から選ばれる、請求の範囲第15項に記載のラベル化試薬。

18. 前記有機基Rは、置換されていても良いフェニル基である、請求の範囲第15項に記載のラベル化試薬。

19. 前記脱離基Xがハロゲン原子である、請求の範囲第11項に記載のラベル化試薬。

20. 前記スルフェニル化合物が、2-ニトロ [¹³C₆] ベンゼンスルフェニルクロリド、4-ニトロ [¹³C₆] ベンゼンスルフェニルクロリド、2, 4-ジニトロ [¹³C₆] ベンゼンスルフェニルクロリド、及び2-ニトロ-4-カルボキシ [¹³C₆] ベンゼンスルフェニルクロリドからなる群から選ばれる、請求の範囲第11項に記載のラベル化試薬。

21. ペプチドの解析の用途における、請求の範囲第11項に記載のラベル化試薬。

22. 前記スルフェニル化合物から選ばれた1つの化合物と、前記選ばれた1つの化合物（重い試薬）と同一構造であり且つ前記同位体で標識されていない化合物（軽い試薬）とをそれぞれ別個に含む、請求の範囲第11項に記載のラベル化試薬。

23. 一般式：



（式中、Rは、同位体で標識された少なくとも1つの構成元素を有する有機基を表し、Xは脱離基を表す。）

で表されるスルフェニル化合物を含むラベル化試薬を用いるペプチドの解析法。

24. 前記有機基Rは構成元素としてC、H、N、場合によりO及び/又はPを含み、前記同位体は、²H、¹³C、¹⁵N、¹⁷O、¹⁸Oからなる群から選ばれる安定同位体である、請求の範囲第23項に記載のペプチドの解析法。

25. 前記スルフェニル化合物の分子量が、前記化合物と同一構造であり且つ前記同位体で標識されていない化合物の分子量よりも3～12大きい、請求の範囲第23項に記載のペプチドの解析法。

26. 前記同位体で標識された構成元素の数が3以上である、請求の範囲第23項に記載のペプチドの解析法。

27. 前記有機基Rは、置換されていても良いアルキル基又はアリール基である、請求の範囲第23項に記載のペプチドの解析法。

28. 前記置換されていても良いアルキル基が有する置換基は、NO₂基、COOH基、SO₃H基、OH基、アルコキシ基、アリール基、アリールオキシ基からなる群から選ばれる、請求の範囲第27項に記載のペプチドの解析法。

29. 前記置換されていても良いアリール基が有する置換基は、NO₂基、COOH基、SO₃H基、OH基、アルキル基、アルコキシ基、アリール基、アリールオキシ基からなる群から選ばれる、請求の範囲第27項に記載のペプチドの解析法。

30. 前記有機基Rが置換されていても良いフェニル基である、請求の範囲第27項に記載のペプチドの解析法。

31. 前記脱離基Xが、ハロゲン原子である、請求の範囲第23項に記載のペプチドの解析法。

32. 前記式(1)で表される同位体で標識されたスルフェニル化合物が、2-ニトロ [¹³C₆] ベンゼンスルフェニルクロリド、4-ニトロ [¹³C₆] ベンゼンスルフェニルクロリド、2, 4-ジニトロ [¹³C₆] ベンゼンスルフェニルクロリド、及び2-ニトロ-4-カルボキシ [¹³C₆] ベンゼンスルフェニルクロリドからなる群から選ばれる、請求の範囲第23項に記載のペプチドの解析法。

33. 前記ラベル化試薬が、前記式(1)で表される同位体で標識されたスルフェニル化合物から選ばれた1つの化合物(重い試薬)と、前記選ばれた化合物と同一構造であり且つ前記同位体で標識されていない化合物(軽い試薬)とをそ

れぞれ別個に含む、請求の範囲第 2 3 項に記載のペプチドの解析法。

34. 前記ラベル化試薬を用いて、解析すべきペプチドのアミノ酸残基をラベル化し、得られたラベル化ペプチドをマスマスペクトロメトリーにより測定する、請求の範囲第 2 3 項に記載のペプチドの解析法。

35. (i) 解析すべきペプチドを、前記式 (1) で表される同位体で標識されたスルフェニル化合物から選ばれた 1 つの化合物 (重い試薬)、及び前記選ばれた化合物と同一構造であり且つ前記同位体で標識されていない化合物 (軽い試薬) のいずれか一方を用いてラベル化し、ラベル化された解析すべきペプチドを得て、

(ii) 別途、対照ペプチドを、前記重い試薬及び前記軽い試薬のいずれか他方を用いてラベル化し、ラベル化された対照ペプチドを得て、

(iii) (i) で得られたラベル化された解析すべきペプチドと (ii) で得られたラベル化された対照ペプチドとを混合し、

(iv) 混合したラベル化ペプチドをマスマスペクトロメトリーによって測定する、請求の範囲第 3 4 項に記載のペプチドの解析法。

36. 必要に応じて酵素消化及び／又は還元とアルキル化とによる化学的処理を行う、請求の範囲第 3 4 項に記載のペプチドの解析法。

37. 前記酵素消化を前記ラベル化の前又は後に行う、請求の範囲第 3 6 項に記載のペプチドの解析法。

38. 前記化学的処理を前記ラベル化の前又は後に行う、請求の範囲第 3 6 項に記載のペプチドの解析法。

39. 前記化学的処理、前記酵素消化、及び前記ラベル化をこの順で行う、請求の範囲第 3 6 項に記載のペプチドの解析法。

40. 前記化学的処理、前記ラベル化、及び前記酵素消化をこの順で行う、請求の範囲第 3 6 項に記載のペプチドの解析法。

41. 前記ラベル化、前記化学的処理、及び前記酵素消化をこの順で行う、請

求の範囲第36項に記載のペプチドの解析法。

42. 前記ラベル化の後、必要に応じゲル濾過による分離と逆相カラムを用いる分離とを含むラベル化ペプチドの精製を行う、請求の範囲第34項に記載のペプチドの解析法。

43. 前記アミノ酸残基がトリプトファン残基である、請求の範囲第34項に記載のペプチドの解析法。

44. 請求の範囲第23項に記載のペプチドの解析法によって見出されるペプチドを含む新規化合物。

45. 請求の範囲第23項に記載のペプチドの解析法によって見出されるペプチドを含む新規化合物から開発される医薬品候補化合物。

1/6

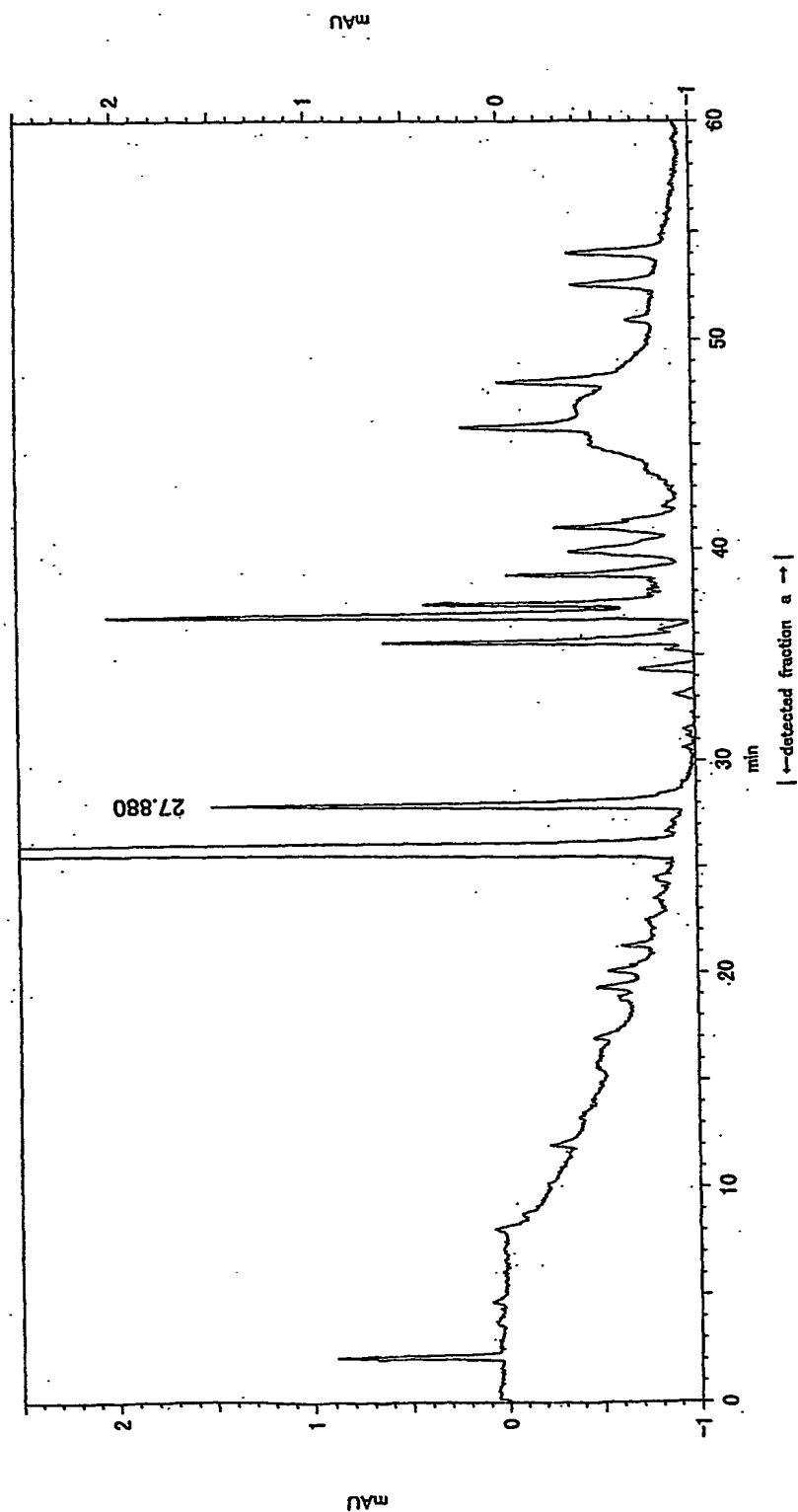


図 1

2/6

図 2

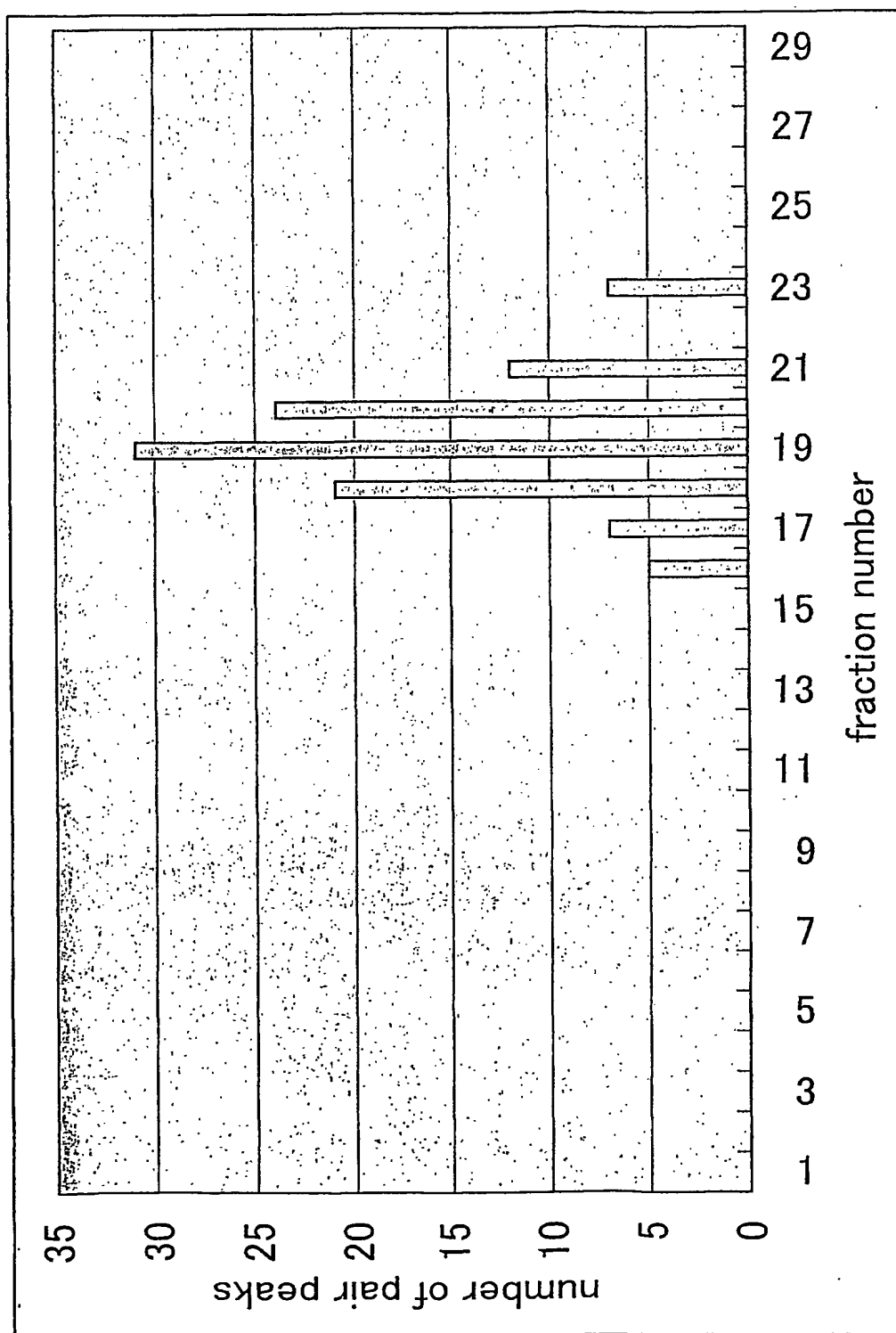


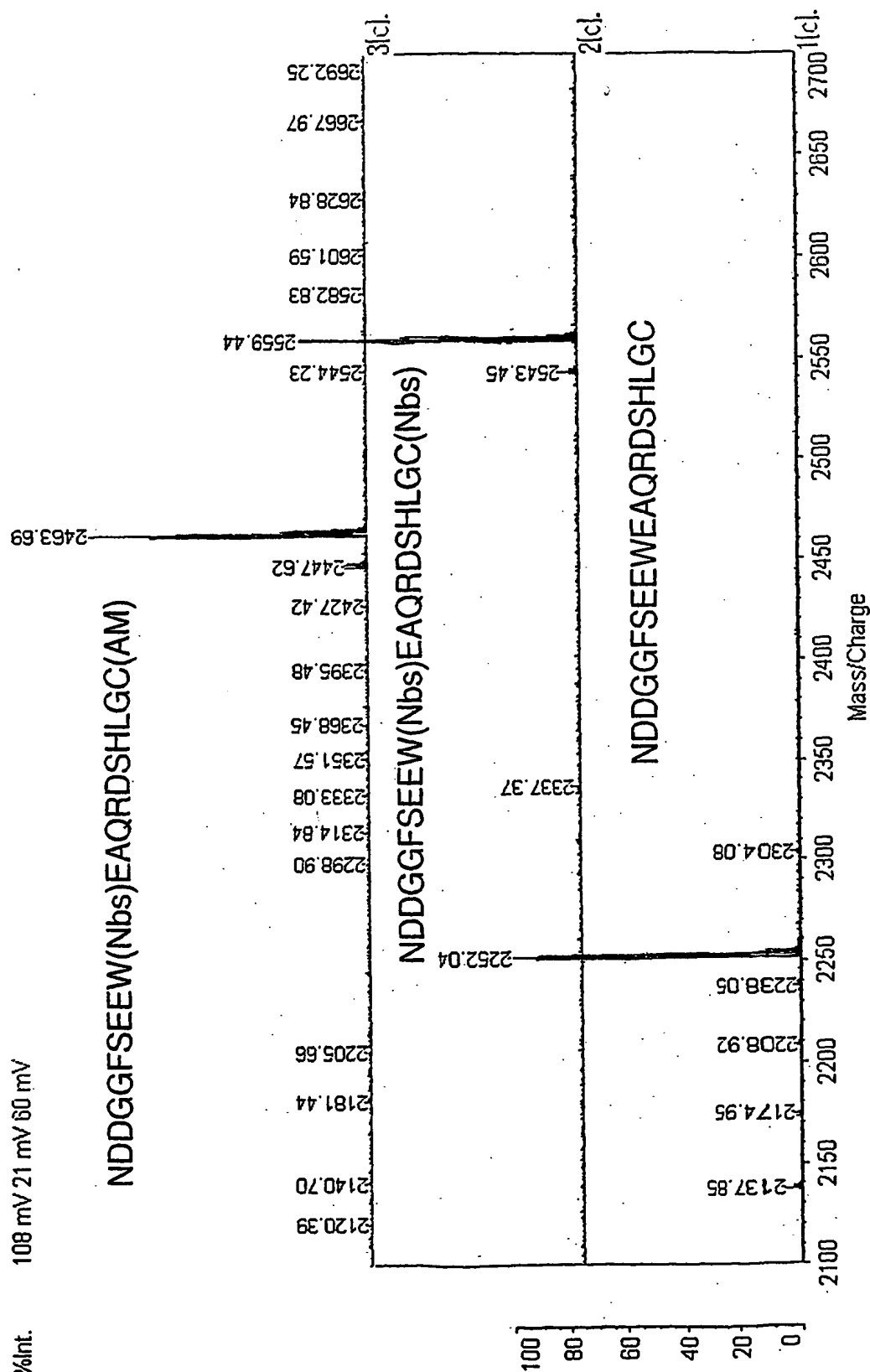
図 3

%Int.

108 mV 21 mV 60 mV

NDDGGFSEEW(Nbs)EAQRDHLGC(AM)

差 替 え 用 紙 (規則26)



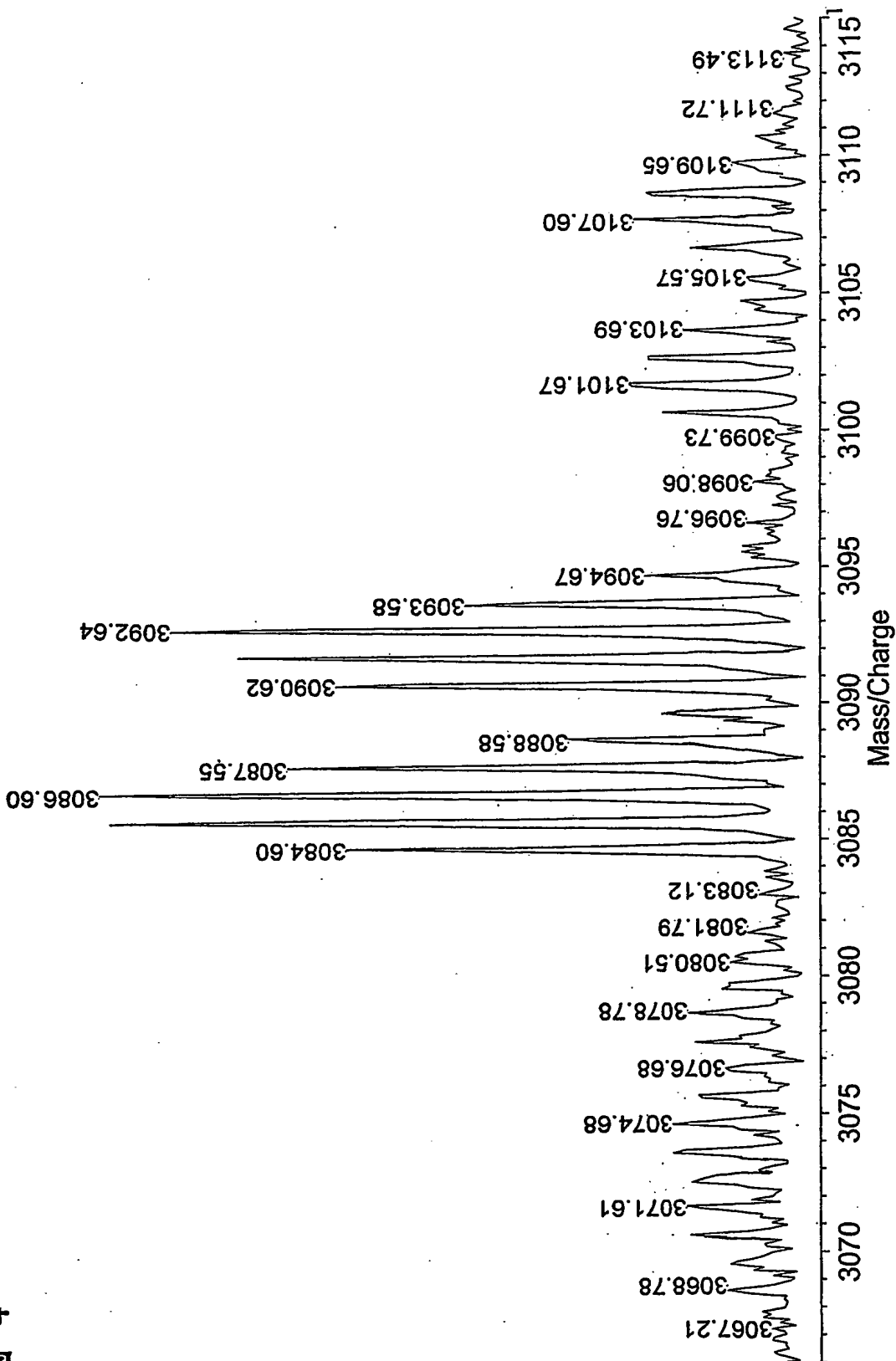


図 4

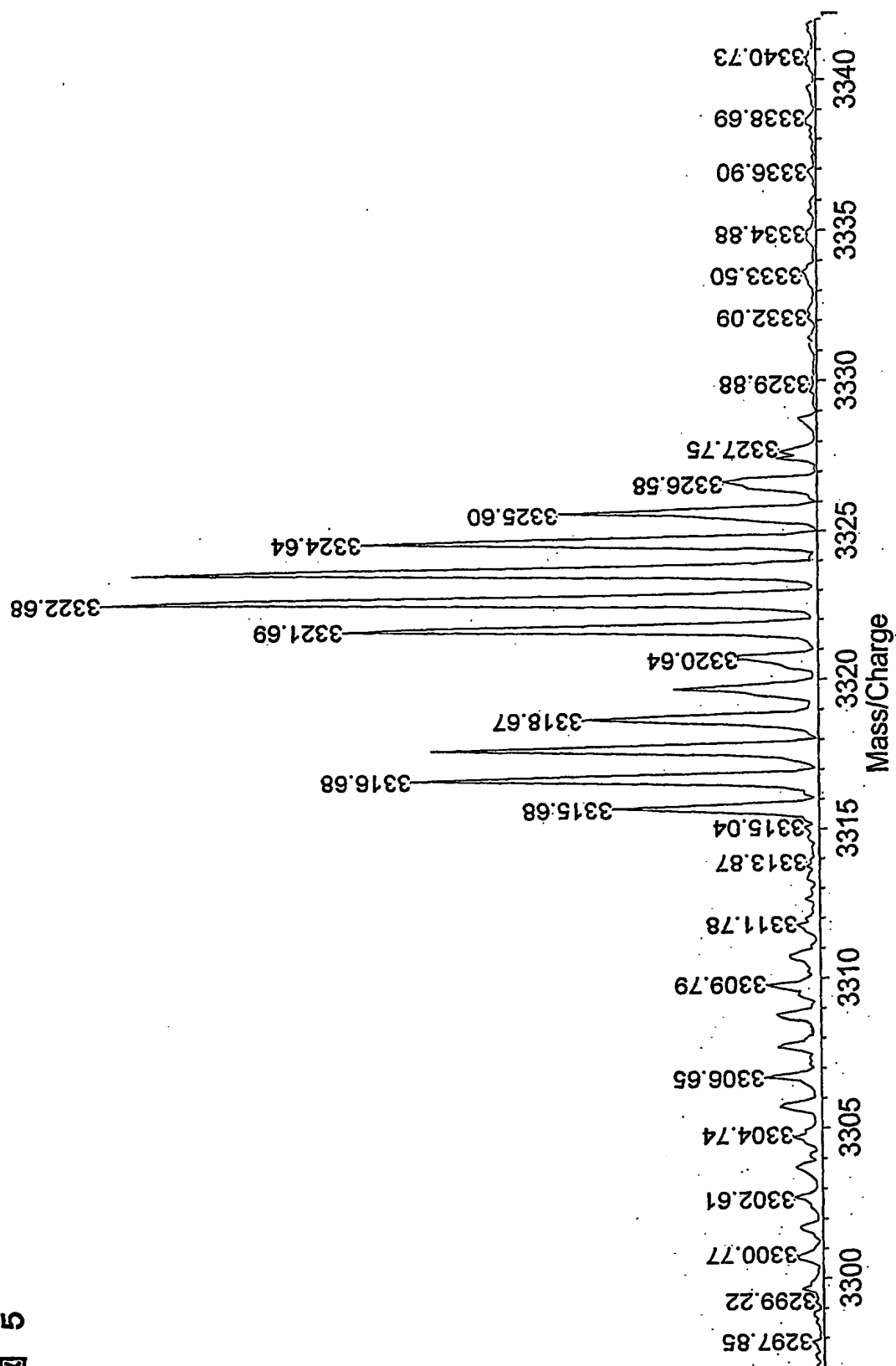


図 5

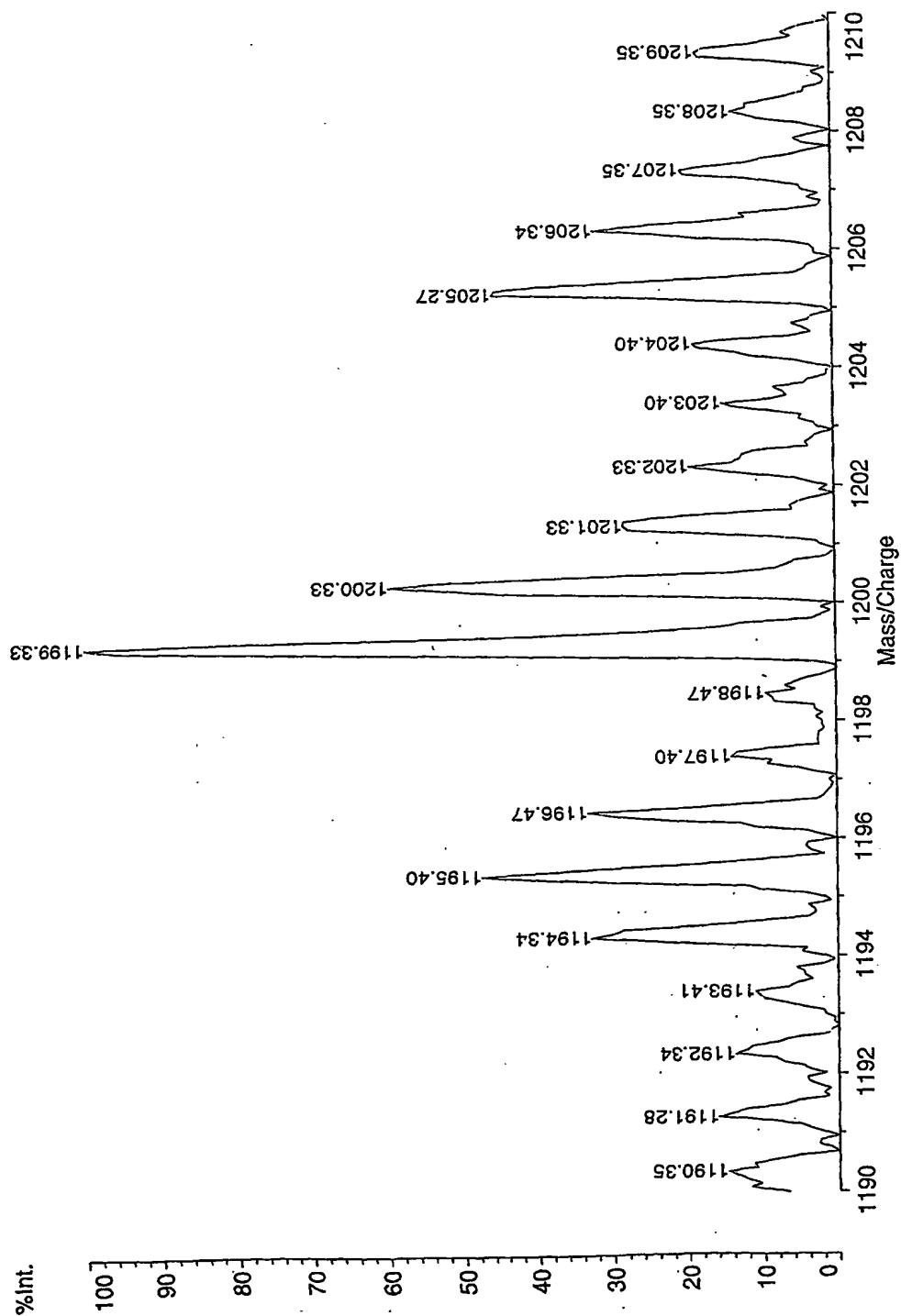


図 6

SEQUENCE LISTING

<110> SHIMADZU CORPORATION

<120> sulfenyl compound, labelling reagent, and method for analyzing peptide

<130> G102027 WO

<150> JP 2002-191496

<151> 2002-06-28

<150> JP 2002-191497

<151> 2002-06-28

<160> 15

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: presinilin-1(331-349)-Cys

<400> 1

Asn Asp Asp Gly Gly Phe Ser Glu Glu Trp Glu Ala Gln Arg Asp Ser

1

5

10

15

His Leu Gly Cys

20

<210> 2

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: labelled presinilin-1(331-349)-Cys

<220>

2/5

<221> BINDING

<222> (10)

<223> 2-nitro-phenylthio-group

<220>

<221> BINDING

<222> (20)

<223> 2-nitro-phenylthio-group

<400> 2

Asn Asp Asp Gly Gly Phe Ser Glu Glu Trp Glu Ala Gln Arg Asp Ser
1 5 10 15

His Leu Gly Cys
20

<210> 3

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: amidemethylated labelled
presinilin-1(331-349)-Cys

<220>

<221> BINDING

<222> (10)

<223> 2-nitro-phenylthio-group

<220>

<221> BINDING

<222> (20)

<223> amidemethyl-group

<400> 3

Asn Asp Asp Gly Gly Phe Ser Glu Glu Trp Glu Ala Gln Arg Asp Ser
1 5 10 15

His Leu Gly Cys
20

3/5

<210> 4
<211> 4
<212> PRT
<213> Bos taurus

<400> 4
Ile Trp Cys Lys
1

<210> 5
<211> 8
<212> PRT
<213> Bos taurus

<400> 5
Leu Asp Gln Trp Leu Cys Glu Lys
1 5

<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> Bos taurus

<400> 6
Leu Asp Gln Trp Leu Cys Glu Lys Leu
1 5

<210> 7
<211> 10
<212> PRT
<213> Bos taurus

<400> 7
Val Gly Ile Asn Tyr Asn Leu Ala His Lys
1 5 10

<210> 8
<211> 5

4 / 5

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 8

Gly Leu Trp Glu Lys

1

5

<210> 9

<211> 8

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 9

Gly Leu Trp Glu Lys Ala Phe Lys

1

5

<210> 10

<211> 14

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 10

Leu Ile Ser Trp Tyr Asp Asn Glu Phe Gly Tyr Ser Asn Arg

1

5

10

<210> 11

<211> 4

<212> PRT

<213> *Gallus gallus*

<400> 11

Glu Trp Thr Arg

1

<210> 12

<211> 8

<212> PRT

<213> *Gallus gallus*

5/5

<400> 12

Glu Trp Thr Arg Met Val Ile Arg

1

5

<210> 13

<211> 6

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 13

Ala Trp Ala Val Ala Arg

1

5

<210> 14

<211> 7

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 14

Asn Thr Ala Ala Trp Ala Lys

1

5

<210> 15

<211> 5

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 15

Trp Lys Ile Arg Lys

1

5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP03/04308

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C07C313/08, C07B59/00, G01N33/68, G01N27/62, A61K38/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C07C313/00, C07B59/00, G01N33/00, G01N27/00, A61K38/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

REGISTRY (STN), CA (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| X Y | MIURA, Yuzo et al., Generation, Isolation, and Characterization of N-(Arylthio)-7-tert-butyl- and N-(Arylthio)-2,7-di-tert-butyl-1-pyrenylaminyl Radicals, Journal of Organic Chemistry, 1994, Vol.59, No.12, page 3294 to 3300 | 1-9 1-45 |
| X Y | MIURA, Yuzo et al., ESR studies of nitrogen-centered free radicals. 40. Exceptionally persistent nitrogen-centered free radicals, Journal of Organic Chemistry, 1991, Vol.56, No.23, pages 6638 to 6643 | 1-9 1-45 |



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier document but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
11 July, 2003 (11.07.03)

Date of mailing of the international search report
29 July, 2003 (29.07.03)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/04308

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| X Y | MIURA, Yuzo et al., ESR studies of nitrogen-centered free radicals. 28. Oxygen-17-and sulfur-33-hyperfine splittings for aromatic RCO(ArS)N· radicals, Bulletin of the Chemical Society of Japan, 1986, Vol.59, No.10, pages 3291 to 3292 | 1-9 1-45 |
| X Y | EFFENBERGER, Franz et al., Synthesis and reactions of sulfenic trifluoromethanesulfonic anhydrides, Chemische Berichte, 1982, Vol.115, No.12, pages 3719 to 3736 | 1-9 1-45 |
| X Y | HARPP, David et al., Organic sulfur chemistry. 33. Chemistry of sulfenic sulfonic thioanhydrides, Journal of Organic Chemistry, 1979, Vol.44, No.23, pages 4135 to 4140 | 1-9 1-45 |
| X Y | SAITO, Hiroshi et al., Matrix IR spectra and normal coordinate analysis for methanesulphenyl chloride and isotopic analogs, Spectrochimica Acta, Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 1995, Vol.51A, No.14, pages 2447 to 2451 | 1-9 1-45 |
| X Y | NOEL, J.P. et al., Synthesis of 3-[(2,6- ¹⁴ C)-2-pyridinyl-dithio]propanoic acid, a covalent coupling reagent, Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals, 1983, Vol.20, No.11, pages 1243 to 1256 | 1-9 1-45 |
| Y | WO 00/11208 A1 (University of Washington), 02 March, 2000 (02.03.00), & EP 1105517 A1 & JP 2002-523058 A & US 2002/76739 A1 | 1-45 |
| Y | Edited by The Japanese Biochemical Society, "Tanpakushitsu IV Kozo Kino Sokan", Tokyo Kagaku Dojin, 1991, pages 57 to 58, 64 to 66 | 1-45 |

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

IntCl¹ C07C313/08, C07B59/00, G01N33/68, G01N27/62
A61K38/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

IntCl¹ C07C313/00, C07B59/00, G01N33/00, G01N27/00
A61K38/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

REGISTRY (STN), CA (STN)

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|--|------------------|
| X Y | MIURA, Yuzo et al., Generation, Isolation, and Characterization of N-(Arylthio)-7-tert-butyl- and N-(Arylthio)-2, 7-di-tert-butyl-1-pyrenylaminy Radicals, Journal of Organic Chemistry, 1994, Vol. 59, No. 12, p. 3294-3300 | 1-9 1-45 |
| X Y | MIURA, Yuzo et al., ESR studies of nitrogen-centered free radicals. 40. Exceptionally persistent nitrogen-centered free radicals, Journal of Organic Chemistry, 1991, Vol. 56, No. 23, p. 6638-6643 | 1-9 1-45 |

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

- の日の後に公表された文献
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

11.07.03

国際調査報告の発送日

29.07.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)
郵便番号 100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

前田 憲彦

4H

8318

印

電話番号 03-3581-1101 内線 3443

C (続き). 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|---|------------------|
| X Y | MIURA, Yuzo et al., ESR studies of nitrogen-centered free radicals. 28. Oxygen-17- and sulfur-33-hyperfine splittings for aromatic RCO(ArS)N· radicals, Bulletin of the Chemical Society of Japan, 1986, Vol.59, No.10, p.3291-3292 | 1-9 1-45 |
| X Y | EFFENBERGER, Franz et al., Synthesis and reactions of sulfenic trifluoromethanesulfonic anhydrides, Chemische Berichte, 1982, Vol.115, No.12, p.3719-3736 | 1-9 1-45 |
| X Y | HARPP, David et al., Organic sulfur chemistry. 33. Chemistry of sulfenic sulfonic thioanhydrides, Journal of Organic Chemistry, 1979, Vol.44, No.23, p.4135-4140 | 1-9 1-45 |
| X Y | SAITO, Hiroshi et al., Matrix IR spectra and normal coordinate analysis for methanesulfenyl chloride and isotopic analogs, Spectrochimica Acta, Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 1995, Vol.51A, No.14, p.2447-2451 | 1-9 1-45 |
| X Y | NOEL, J. P. et al., Synthesis of 3-[(2,6-14C)-2-pyridinyl-dithio]propanoic acid, a covalent coupling reagent, Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals, 1983, Vol.20, No.11, p.1243-1256 | 1-9 1-45 |
| Y | WO 00/11208 A1 (University of Washington) 2000.03.02 & EP 1105517 A1 & JP 2002-523058 A & US 2002/76739 A1 | 1-45 |
| Y | 日本生化学会編「タンパク質IV 構造機能相関」東京化学同人 (1991年) 第57-58, 64-66頁 | 1-45 |